

不同剂量四氯化碳诱导家兔肝纤维化模型的建立*

丁 可^{1,2},刘满荣³,吴奇新¹,唐建华⁴,曾阳东²,马 宇²

(1. 广西壮族自治区南宁市第二人民医院放射科 530031;2. 桂林医学院附属医院放射科,广西桂林 541001;
3. 广西壮族自治区南宁市第二人民医院超声科 530031;4. 桂林医学院附属医院超声科,广西桂林 541001)

摘 要:目的 探讨建立家兔纤维化模型的 CCl₄ 最佳剂量。方法 将 50 只健康雄性家兔随机分为 5 组,每组 10 只,分别用 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mL/kg 剂量的纯 CCl₄ 对 1~5 组家兔进行皮下注射(每周 2 次)建立肝纤维化模型,并于注药后 4、8、12 周在 B 超引导下肝穿刺病理活检,对比研究不同剂量 CCl₄ 建立家兔肝纤维化模型的效果。结果 家兔死亡多发生在 3 周之内,5 周之后趋于稳定。至 12 周,1~5 组家兔存活数及肝纤维化成模率分别为:8 只(60%)、7 只(70%)、3 只(40%)、1 只(20%)、0 只(10%)。结论 当 CCl₄ 的给予剂量大于 1.0 mL/kg 时易导致家兔急性中毒而死亡;皮下注射 0.5 mL/kg 剂量的纯 CCl₄,家兔死亡率低,肝纤维化成模率高。

关键词:四氯化碳;模型;动物;兔;肝硬化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.04.030 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2014)04-0456-03

Establishment of liver fibrosis in rabbit model by injecting different doses of carbon tetrachloride*

Ding Ke^{1,2},Liu Manrong³,Wu Qixin¹,Tang Jianhua⁴,Zeng Yangdong²,Ma Yu²

(1. Department of Radiology, the Second People's Hospital of Nanning, Nanning, Guangxi 530031, China;
2. Department of Radiology, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541001, China;
3. Department of Ultrasound, the Second People's Hospital of Nanning, Nanning, Guangxi 530031, China;
4. Department of Ultrasound, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541001, China)

Abstract:Objective To explore the optimal dose of carbon tetrachloride(CCl₄) in establishment of rabbit model of hepatic fibrosis. **Methods** A total of 50 healthy male rabbits were randomly and averagely divided into 5 groups. Then established rabbit model of hepatic fibrosis by subcutaneous injecting different dose(0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mL/kg) of pure CCl₄, twice a week. Ultrasound-guided liver puncture pathological examination were performed at 4, 8 and 12 weeks after injection, and the effect of different doses of CCl₄ were comparative studied. **Results** Death of the models usually happened within 3 weeks after first injection and became stable after 5 weeks. To 12 weeks, the number of survived rabbits of 1 to 5 groups were 8, 7, 3, 1, 0 respectively, and the success rate of the liver fibrosis were 60%, 70%, 40%, 20%, 10% respectively. **Conclusion** The rabbits prone to acute poisoning and death when CCl₄ given doses are greater than 1.0 mL/kg; Subcutaneous injection of pure CCl₄, at a dose of 0.5 mL/kg, twice a week, can establish rabbit model of hepatic fibrosis with low mortality and high success rate.

Key words:carbon tetrachloride; animal model; rabbits; liver cirrhosis

肝纤维化主要表现为肝脏内纤维结缔组织的异常增生和沉积,是慢性肝病的重要病理特征,也是各种慢性肝病向肝硬化发展的必经阶段。肝纤维化向肝硬化发展是一个潜隐渐进而可逆的过程^[1-2],晚期肝硬化则难以逆转,因此,及时阻断肝纤维化发展成为慢性肝病防治中的关键问题^[3]。肝纤维化动物模型的建立是开展肝纤维化防治研究的重要手段,也是进行人体研究的前提^[4]。因饲养简单及肝脏大小适中,家兔为常用的肝纤维化动物模型;以 CCl₄ 诱导肝纤维化模型为国内应用最多的造模方法^[5],但不同剂量 CCl₄ 的造模效果有所不同。本实验拟探讨 CCl₄ 诱导建立家兔纤维化模型的最佳剂量,以期对相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 选用 6 个月龄雄性健康新西兰大白兔 50 只,体重 2.0~2.5 kg,由桂林医学院实验动物中心提供。随机分为 5 组,每组 10 只。所有家兔均饲养在层叠式不锈钢丝笼中,饲

喂由桂林医学院实验动物中心提供的基础颗粒状饲料,自由饮用自来水。兔房通风良好,保持清洁,温度 20~29℃,空气湿度 50%~70%。

1.2 方法

1.2.1 实验试剂及肝穿刺活检枪 实验试剂:分析纯 CCl₄ (含量≥99.5%),广西西陇化工股份有限公司生产。肝穿刺活检枪:半自动型活检针,规格型号“18 G L-130 mm”,制造厂商为日本 TSK 株式会社。

1.2.2 模型制作 分笼正常喂养适应环境 1 周后开始进行造模。将实验家兔分为 5 组:0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mL/kg 剂量组,根据体质量分别给予相应剂量的分析纯 CCl₄ 进行每周 2 次的皮下注射。分别于给药后的第 4、8 周,在 B 超引导下肝右前叶穿刺活检术,注意避开肝脏大的血管和胆管,标本长约 1.5~2.0 cm。造模中途死亡的家兔立即取其肝组织进行病理学检查。造模后的第 12 周,采用耳缘静脉注射空气栓塞法处

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81060119);广西自然科学基金资助项目(2013GXNSFAA019267,2010GXNSFB013088)。作者简介:丁可(1976—),副主任医师,博士,主要从事慢性肝病的基础和影像学研究。

表 1 各组家兔用药后 1~12 周死亡情况

组别	n	死亡(n)												死亡率 (%)
		1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周	8 周	9 周	10 周	11 周	12 周	
0.2 mL/kg	10	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
0.5 mL/kg	10	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	30
1.0 mL/kg	10	4	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	70
2.0 mL/kg	10	6	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	90
5.0 mL/kg	10	7	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	100

死存活的所有实验兔,取大小约 1.5 cm×1.0 cm×0.3 cm 的肝脏标本送病检。

1.2.3 病理学检查 对所有肝脏标本分别进行苏木精-伊红(HE)及 Masson 三色染色病理学检查。以 2000 年西安会议方案为标准^[6],根据纤维组织增生情况,将肝纤维化分为 S₀~S₄ 5 期,动态观察 CCl₄ 诱导建立家兔肝纤维化模型过程中的肝组织病理学变化。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。各组家兔死亡率及肝纤维化成模率的比较采用 χ^2 检验,组间行 χ^2 分割计算,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组家兔用药后的死亡情况 各组家兔用药后 1~12 周死亡情况见表 1。CCl₄ 的给予剂量大于 1.0 mL/kg 时,家兔死亡率显著增高(≥70%),与前两组比较差异有统计学意义($P<0.01$);26 只家兔死亡发生在 3 周之内,5 周之后趋于稳定。实验发现 25 只家兔死亡发生在给药后 24~48 h,其余 6 只则发生于肝穿刺后的数天。死亡兔的肝脏病理显示:0.5 mL/kg 剂量组第 5 周死亡兔的肝脏伴有脂肪变,1.0 mL/kg 剂量组 8 周死亡兔的肝脏可见纤维化形成,2.0 mL/kg 剂量组 9 周死亡兔的肝脏显示肝纤维化,5.0 mL/kg 剂量组 7 周死亡兔的肝脏可见大片坏死伴有纤维化,其余死亡家兔仅可见不同程度的肝细胞肿胀、坏死,均无肝纤维化形成。

2.2 各组家兔用药后肝纤维化只数及建模成功率 0.2 mL/kg 组第 12 周存活兔最多,但只有 6 只可见肝纤维化形成,建模成功率为 60%,其中仅有 2 只发展为肝硬化(G₄S₄),另外 4 只中,2 只为 G₁S₁,G_{1~2}S₂ 和 G₃S₃ 各 1 只。0.5 mL/kg 剂量组第 12 周存活兔为 7 只,但 7 只均成功建立起肝纤维化模型,故建模成功率最高,达 70%,且其中的 5 只已经发展至肝硬化(G₄S₄),2 只家兔中 G_{2~3}S₂ 和 G₃S₃ 各 1 只)。其余 3 组建模成功率都较低,且剂量越大成功率越低。后 3 组肝纤维化成模率显著低于前 2 组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 各组家兔用药后肝纤维化只数及建模成功率

组别	n	死亡兔	第 12 周	存活兔	肝纤维化
		肝纤维化(n)	存活兔(n)	肝纤维化(n)	成模率(%)
0.2 mL/kg	10	0	8	6	60
0.5 mL/kg	10	0	7	7	70
1.0 mL/kg	10	1	3	3	40
2.0 mL/kg	10	1	1	1	20
5.0 mL/kg	10	1	0	0	10

3 讨 论

氯化烷烃类化合物 CCl₄ 是一种选择性肝毒性药物,给予

长期反复的 CCl₄ 刺激可诱导肝纤维化形成^[7]。用 CCl₄ 诱导的肝纤维化模型具有成模时间短、简便、价廉、重复性好及病理特征稳定可靠等特点,在形态学和病理生理学的某些方面与人肝纤维化相似,如两者均有肝细胞坏死后的再生,实验动物表现的体征及肝功能异常与人慢性肝病进展为肝硬化时相似,因而成为国内应用最多的造模方法^[5]。本研究显示,家兔肝纤维化的严重程度与炎症关系密切,肝纤维化的程度(病理分期)越重,其炎症活动度(病理分级)也就越大,说明家兔肝纤维化模型的病理学分级与病理分期呈正相关关系,这与人的慢性肝病-肝纤维化的病理学特点相似,可见 CCl₄ 诱导建立家兔肝纤维化模型的良好效果。用 CCl₄ 诱导的肝纤维化动物模型可广泛应用于肝纤维化发生机制、血清学标志物与组织病理的相关性及抗纤维化药物的筛选等研究。

CCl₄ 诱导建立肝纤维化模型的途径有口服、腹腔注射和皮下注射等,多位学者采用皮下注射的方法成功建立起大鼠的肝纤维化/肝硬化模型^[8-9]。周贤等^[9]将 Wistar 大鼠随机分成血清组、CCl₄ 皮下注射组、CCl₄ 腹腔注射组进行肝纤维化造模,研究显示 CCl₄ 皮下注射组制备肝纤维化模型的动物死亡率较低,肝纤维化形成时间较短,是一种制作肝纤维化模型较好的方法。刘满荣等^[10]通过不同给药途径建立家兔肝纤维化模型的对比研究亦认为,皮下注射法 CCl₄ 造模是制作肝纤维化模型的最佳给药途径。CCl₄ 进入体内 15 min 即可引起肝细胞损害,至 48 h 达到高峰,随后进入修复阶段。1~2 d 给药一次容易导致动物急性中毒死亡,而给药间隔超过 4~5 d 时,肝脏可通过较强的肝细胞再生等修复机制迅速恢复肝功能,因此,有效维持 CCl₄ 肝损伤效果的最适合给药间隔时间为 3 d^[11]。结合文献报道,本研究采用皮下注射的方法进行造模,并确定给药频率为每周 2 次。

CCl₄ 为选择性肝剧毒药物,其肝毒性作用迅速而剧烈,进入体内 48 h 肝细胞损害达到高峰,易导致动物急性中毒而死亡,故实验中家兔死亡多发生于给药后的 1~2 d。经过一段时间的适应期,动物对 CCl₄ 的耐受性相对增强,所以家兔死亡多发生在造模后 3 周之内,5 周之后趋于稳定。另有 6 只家兔于肝穿刺后的数天死亡,穿刺前的实验室检查均显示肝功能下降明显,病理标本可见不同程度肝细胞肿胀、坏死伴有出血,故考虑与实验兔受药后体质下降,肝功能损害导致易出血倾向或穿刺后急性创伤有关。

CCl₄ 成模时间由给药途径和剂量决定,一般造模时间为 8 周至 4 个月^[12]。Chang 等^[13]的研究表明,CCl₄ 诱导小鼠肝纤维化形成的时间主要取决于 CCl₄ 的剂量,增加剂量可以缩短造模时间,但同时使死亡率大大增加,因而在常用且安全有效的皮下注射造模法中,探讨建立肝纤维化模型的最佳 CCl₄ 剂量实属必要。1.0、2.0、5.0 mL/kg 剂量组的家兔死亡率都很高,至 12 周时的死亡率分别高达 70%、90%和 100%,显著高于

0.2 mL/kg 剂量组的 20%和 0.5 mL/kg 剂量组的 30%,可见 CCl₄ 的肝脏毒性作用随着剂量的增加而增大,安全造模的 CCl₄ 给予剂量应该小于 1.0 mL/kg 体质量,否则极易导致家兔急性中毒而死亡。由于死亡率较高,故 1.0、2.0、5.0 mL/kg 剂量组的肝纤维化成模率都较低,仅分别为 40%、20%和 10%,显著低于 0.2 mL/kg 剂量组的 60%和 0.5 mL/kg 剂量组的 70%成模率。实验结果还显示,0.5 mL/kg 剂量组的肝纤维化和肝硬化成模时间都要短于 0.2 mL/kg 剂量组,由此可见,在安全有效造模的前提下,0.5 mL/kg 剂量的 CCl₄ 更易诱导建立肝纤维化/肝硬化模型,可视为建立家兔纤维化模型的最佳 CCl₄ 剂量。

参考文献:

[1] Ramachandran P,Iredale JP. Reversibility of liver fibrosis[J]. *Ann Hepatol*,2009,8(4):283-291.

[2] Ismail MH,Pinzani M. Reversal of liver fibrosis[J]. *Saudi J Gastroenterol*,2009,15(1):72-79.

[3] Fallowfield JA,Iredale JP. Reversal of liver fibrosis and cirrhosis-an emerging reality[J]. *Scott Med J*,2004,49(1):3-6.

[4] 刘平,高云华. 肝纤维化动物模型的建立[J]. *世界华人消化杂志*,2002,10(6):693-695.

[5] 周伟,沈微. 肝细胞增殖、凋亡与肝纤维化关系的实验研究[J]. *重庆医学*,2007,36(11):1062-1064.

[6] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会,肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. *中华传染病杂志*,2001,19(1):56-62.

(上接第 455 页)

Fertility outcome of infertile women with adenomyosis treated with the combination of a conservative microsurgical technique and GnRH agonist: Long-term follow-up in a series of nine patients[J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*,2012,51(3):212-216.

[5] Wang PH,Su WH,Sheu BC,et al. Adenomyosis and its variance;adenomyoma and female fertility[J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*,2009,48(3):232-238.

[6] Benson RC,Sneed VD. Adenomyosis: a reappraisal of symptomatology[J]. *Am J Obstet Gynecol*,1958,76(5):1044-1057.

[7] Osada H,Silber S,Kakinuma T,et al. Surgical procedure to conserve the uterus for future pregnancy in patients suffering from massive adenomyosis[J]. *Reproductive Bio Medicine Online*,2011,22(1):94-99.

[8] Fedele L,Bianchi S,Zanotti F,et al. Fertility after conservative surgery for adenomyomas [J]. *Hum Reprod*,1993,8(10):1708-1710.

[9] Wood C,Maher P,Hill D. Biopsy diagnosis and conservative surgical treatment of adenomyosis[J]. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*,1994,1(4):313-316.

[10] Phillips DR,Nathanson HG,Milim SJ,et al. Laparoscopic bipolar coagulation for the conservative treatment of adenomyomata[J]. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*,1996,4

[7] Wang L,Potter JJ,Rennie-Tankersley L,et al. Effects of retinoic acid on the development of liver fibrosis produced by carbon tetrachloride in mice[J]. *Biochim Biophys Acta*,2007,1772(1):66-71.

[8] Sato R,Maesawa C,Fujisawa K,et al. Prevention of critical telomere shortening by oestradiol in human normal hepatic cultured cells and carbon tetrachloride induced rat liver fibrosis[J]. *Cut*,2004,53(7):1001-1009.

[9] 周贤,刘翼,夏国栋,等. 肝纤维化动物模型探讨[J]. *四川动物*,2010,29(1):114-115.

[10] 刘满荣,丁可,唐建华,等. 四氯化碳不同给药途径建立家兔肝纤维化模型的比较[J]. *广东医学*,2013,34(4):525-527.

[11] 张海燕,温韬,卢静,等. 四氯化碳诱导大鼠慢性肝损伤模型方法的探讨[J]. *实用肝脏病杂志*,2009,12(3):161-163.

[12] Simeonova PP,Gallucci RM,Hulderman T,et al. The role of tumor necrosis factor- α in liver toxicity,inflammation, and fibrosis induced by carbon tetrachloride[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,2001,177(2):112-120.

[13] Chang ML,Yeh CT,Chang PY,et al. Comparison of murine cirrhosis models induced by hepatotoxin administration and common bile duct ligation[J]. *World J Gastroenterol*,2005,11(27):4167-4172.

(收稿日期:2013-08-22 修回日期:2013-10-25)

(1):19-24.

[11] Fan TY,Zhang L,Chen WZ,et al. Feasibility of MRI-guided high intensity focused ultrasound treatment for adenomyosis[J]. *Eur J Radiol*,2012,(81):3624-3630.

[12] Gavrilova-Jordan LP,Rose CH,Traynor KD,et al. Successful term pregnancy following MR-guided focused ultrasound treatment of uterine leiomyoma[J]. *J Perinatol*,2007,27(1):59-61.

[13] Dicle O,Kuctkler C,Pimar T,et al. Magnetic resonance imaging evaluation of incision healing after cesarean after cesarean sections[J]. *Eur Radiol*,1997,7(1):31-34.

[14] Al Hilli MM,Stewart EA. Magnetic resonance-guided focused ultrasound surgery[J]. *Semin Reprod Med*,2010,28(3):242-249.

[15] Rabinovici J,Inbar Y,Eylon SC,et al. Pregnancy and live birth after focused ultrasound surgery for symptomatic focal adenomyosis:a case report[J]. *Hum Reprod*,2006,21(5):1255-1259.

[16] Rabinovici J,David M,Fukunishi H. Pregnancy outcome after magnetic resonance-guided focused ultrasound surgery(MRgFUS) for conservative treatment of uterine fibroids[J]. *Fertility Sterility*,2010,93(1):199-209.

(收稿日期:2013-09-08 修回日期:2013-11-04)